

SVERIGE

(19) SE



Översättning av europeisk patentskrift (T 3)

(87) Europeiskt publ nr 0548228 1998:47

(86) Europeiskt ansökningsnr 91916986.2

(51) Internationell klass⁶

PATENTVERKET

C12N 9/20 C12N 15/55 C11D 3/386 C12N 5/14

(86) Ingivningsdag för ansökan
om europeiskt patent
91-09-13

(45) Meddelandedatum för
det europeiska patentet
98-08-12

(60) Stamansökans nummer

(24) Löpdag

(30) Prioritetsuppgifter
90-09-13 DK 219490
90-09-13 DK 219690

90-09-13 DK 219590

(54) Benämning
Lipasvarianter

(73) Patenthavare

NOVO NORDISK A/S, 2880 Bagsvaerd DK

(72) Upphinnare

A . SVENDSEN , DK-3460 Birkeroed DK
I . CLAUSEN , DK-2920 Charlottenlund DK
S . PATKAR , DK-2800 Lyngby DK
E . GORMSEN , DK-2830 Virum DK

(84) Designerade stater

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Siffrorna inom parentes anger internationell identifieringskod, INID-kod

NZAS-0027030

NOVO NORDISK A/S
EPC 91916986.2
2988626/Frida Björk/MMR

LIPASVARIANTER

UPPFINNINGENS OMRÅDE

Föreliggande uppfinning hänför sig till nya lipasenzymvarianter med förbättrade egenskaper, DNA-konstruktioner som kodar för expressionen av varianterna, värdceller som uppvisar förmåga att uttrycka varianterna från DNA-konstruktionerna och till ett förfarande för framställning av varianterna genom odling av nämnda värdceller.

10 BAKGRUND TILL UPPFINNINGEN

Tillkomsten och utvecklingen av rekombinanta DNA-metoder har haft ett stort inflytande på området protein-kemi. Man räknar med att dessa metoder möjliggör framställningen av peptider och proteiner, såsom enzymer, i enlighet med specifika kriterier, vilket således möjliggör framställning av föreningar med önskade egenskaper.

15 Beroende på tillgängligheten av sådana metoder har det visat sig vara möjligt att framställa enzymer med önskade aminosyrasekvenser och ansenlig forskning har ägnats åt detta.

20 Primärstrukturen för ett antal lipaser har bestämts och beskrivits i litteraturen (Boel et al., *Lipids* **23**, 701-706 (1988), de Caro et al., *Biochim. Biophys. Acta* **671**, 129-138 (1981), Winkler et al., *Nature* **343**, 771-774 (1990)). Dessutom har också tertiärstrukturen för ett mer begränsat antal lipaser klargjorts (Winkler et al., *Nature* **343**, 771-774 (1990), Brady et al., *Nature* **343**, 767-770 (1990) J.D. Schrag et al., *Nature* 351, 1991, sid. 761-764). Från dessa undersökningar verkar det som lipaser ha 25 vissa strukturella särdrag gemensamma men å andra sidan verkar större strukturella variationer också existera bland lipaserna.

SAMMANFATTNING AV UPPFINNINGEN

Ytterligare undersökningar har nu visat att förbättrade egenskaper för lipaser kan erhållas genom en eller flera specifika mutationer i den DNA-sekvens som uttrycker ett specifikt lipas, vilka leder till lipasvarianter som uppvisar sådana förbättrade egenskaper.

Således hänför sig föreliggande uppfinning enligt en aspekt till en lipasvariant från ett moderlipas innefattande en trypsinliknande katalytisk triad innefattande en aktiv serin lokaliserad i en väsentligen hydrofobisk, långsträckt bindningsficka hos lipasmolekylen, vari den elektrostatiske laddningen och/eller hydrofobiciteten i lipidkontaktzonen hos moderlipaset ändras genom deletion eller substitution av en eller flera negativt laddade aminosyrarester med neutral(a) eller positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom substitution av en eller flera neutrala aminosyrarester med positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom deletion eller substitution av en eller flera hydrofila aminosyrarester med hydrofob(a) aminosyrarest(er). För enkelhets skull benämns denna lipasvariant härafter lipasvariant I.

I föreliggande text avser termen "trypsinliknande" att indikera att moderlipaset innefattar en katalytisk triad vid det aktiva säte som motsvarar det för trypsin, d.v.s. aminosyrorna Ser, His och en av Asp, Glu, Asn och Gln. Vissa lipaser kan också innefatta en på ytan ej basparad region som täcker den aktiva serinen när lipaset föreligger i inaktiv form (ett exempel på ett sådant lipas beskrivs av Brady et al., Nature 343, 1990, sid. 767-770). När lipaset aktiveras ändras den ej basparade regionen för exponering av rester vid det aktiva sätet, varvid en yta med ökad ythydrofobicitet skapas vilken interagerar med lipidsubstratet vid eller under hydrolys. För föreliggande ändamål benämns denna yta "lipidkontaktzon", vilken avser att innefatta aminosyrarester vilka är lokaliserade inom eller utgör del av denna yta. Dessa rester kan medverka vid lipasinteraktion med substratet vid el-

ler under hydrolys när lipaset hydrolyserar triglycerider från lipidfasen vid aktivering genom kontakt med lipidytan. Under hydrolys av triglyceriderna bildas fettsyror och mono- och diglycerider i varierande mängder. En anledning till att ändra den elektrostatiske laddningen och/eller hydrofobiciteten för lipidkontaktzonen genom mutation av lipaset i denna zon är att fettsyrorna som bildas under hydrolys kan bibehållas i lipidfasen, varvid det således bildas en negativt laddad yta. När lipaset används för tvättändamål, kan negativt laddade detergentter bilda negativa laddningar på lipidytan. Således är det möjligt, genom framställning av lipasvarianter vilka är mindre negativt laddade och/eller mer hydrofoba, att erhålla lipaser med andra specificiteter och/eller förbättrade egenskaper.

Föreliggande uppfinning hänför sig också till en DNA-konstruktion innefattande en DNA-sekvens som kodar för en lipasvariant som indikerats ovan, en rekombinant expressionsvektor bärande DNA-konstruktionen, en cell transformerad med DNA-konstruktionen eller expressionsvektorn och till ett förfarande för framställning av en lipasvariant enligt uppfinningen genom odling eller tillväxt av nämnda cell under förhållanden som gynnar framställningen av lipasvarianten, varefter lipasvarianten utvinns från odlingen.

Uppfinningen hänför sig dessutom till en detergenttillsats innefattande en lipasvariant enligt uppfinningen, eventuellt i form av ett granulat som inte dammar, stabiliserad vätska eller skyddat enzym och till en detergentkomposition innefattande lipasvariant enligt uppfinningen.

DETALJERAD BESKRIVNING AV UPPFINNINGEN

I föreliggande beskrivning och krav används följande förkortningar:

Aminosyror

	A = Ala = Alanin
	V = Val = Valin
	L = Leu = Leucin
5	I = Ile = Isoleucin
	P = Pro = Prolin
	F = Phe = Fenylalanin
	W = Trp = Tryptofan
	M = Met = Metionin
10	G = Gly = Glycin
	S = Ser = Serin
	T = Thr = Treonin
	C = Cys = Cystein
	Y = Tyr = Tyrosin
15	N = Asn = Asparagin
	Q = Gln = Glutamin
	D = Asp = Asparginsyra
	E = Glu = Glutaminsyra
	K = Lys = Lysin
20	R = Arg = Arginin
	H = His = Histidin

Vid beskrivning av lipasvarianter enligt uppfinning-
en används följande nomenklatur för enkelhetens skull:

25 Ursprunglig(a) aminosyra(syror): position(er): sub-
stituerad(e) aminosyra(syror).

Enligt denna nomenklatur visas exempelvis substitu-
tion av glycin med glutaminsyra i position 195 som:

Gly 195 Glu eller G195E

30 en deletion av glycin i samma position visas som:

Gly 195* eller G195*

och insättning av ytterligare en aminosyrarest, såsom ly-
sin, visas som:

Gly 195 GlyLys eller G195GK

35

När ett specifikt lipas har utsatts för en "deletion" i förhållande till andra lipaser och en insättning görs i en sådan position indikeras detta som:

* 36 Asp eller *36D

5 för insättning av en asparginsyra i position 36.

Multipla mutationer separeras genom plustecken, d.v.s.:

Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu eller R170Y+G195E
vilket avser mutationer i positionerna 170 och 195, var-
10 vid arginin och glycin substitueras med tyrosin respekti-
ve glutaminsyra.

Företrädesvis är lipasvariant I enligt uppfinningen
ett lipas i vilket en eller flera glutaminsyra- eller as-
parginsyrarester i lipidkontaktzonen hos lipaset substi-
15 tuerats med glutamin, aspargin, alanin, leucin, valin,
serin, treonin, glycin eller arginin.

Fastän moderlipaset kan erhållas från ett flertal
olika källor, såsom däggdjurslipaser, t.ex. pankreatiska,
gastriska, hepatiska eller lipoproteinlipaser, är det
20 vanligen föredraget att lipaset är ett mikrobiellt lipas.
Som sådant kan moderlipaset väljas från jäst, t.ex. lipas
från Candida, bakterier, t.ex. lipaser från Pseudomonas,
eller fungi, t.ex. lipaser från Humicola- eller Rhizomu-
cor. Det är speciellt föredraget att välja moderlipaset
25 från en grupp av strukturellt homologa lipaser.

I en föredragen utföringsform av lipasvariant I en-
ligt uppfinningen är moderlipaset ett Rhizomucor miehei-
lipas, speciellt lipaset som beskrivs i EP 305 216. I
denna utföringsform kan en eller flera negativt laddade
30 aminosyrarester substitueras med en eller flera positivt
laddade eller neutrala aminosyrarester enligt följande:

D91N,K,R,A,V,L,S,T;
 D256N,K,R,A,V,L,S,T;
 D226N,K,R,A,V,L,S,T;
 D61N,K,R,A,V,L,S,T;
 5 D113N,K,R,A,V,L,S,T;
 E201Q,K,R,A,V,L,S,T;
 D243N,K,R,A,V,L,S,T.

I en annan föredragen utföringsform av lipasvariant
 10 I enligt uppfinningen är moderlipaset ett Humicola lanu-
 ginosa-lipas, speciellt lipaset som framställt av H. la-
 nuginosa-stammen DSM 4106 (jämför EP 258 0068). I denna
 utföringsform kan en eller flera negativt laddade amino-
 syrarester substitueras med en eller flera neutrala eller
 15 positivt laddade aminosyrarester enligt följande:

E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V;
 D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
 D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
 E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V;
 20 E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V;
 D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
 D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
 D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
 E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
 25 E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
 E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
 E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
 D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V; eller
 E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V.
 30

Speciellt föredragna substitutioner enligt uppfin-
 ningen är:

E87Q + D254N + D242N + E210Q;
 E87Q + D254N + E210Q;
 35 D96N + E87Q + D254N;
 R209A + E210A.

Alternativt kan en eller flera neutrala aminosyrarester substitueras med en eller flera positivt laddade aminosyrarester enligt följande:

5 T267K,R;
 S85K,R;
 T226K,R;
 N88K,R;
 N92K,R;
10 I255K,R;
 I202K,R
 L206K,R;
 L259K,R;
 V203K,R; eller
15 L227K,R

Det bör noteras att Humicola lanuginosa-lipaset och Rhizomucor miehei-lipaset hör till samma grupp av lipaser. Detta tyder på att de totala tredimensionella strukturerna för de två lipaserna är mycket lika och har visats vara mycket homologa genom röntgenkristallografi (en datormodell över H. lanuginosa-lipaset och Rh. miehei-lipaset visas i Fig. 1A och B respektive 2A och B, från vilka likheterna mellan de två lipasernas lipidkontaktzoner är mycket tydliga). Det är därför sannolikt att modifieringar av typen som indikerats för varje lipas också kommer att fungera för det andra lipaset.

Det bör noteras att vilka modifieringar som helst av aminosyrasekvensen som indikeras ovan, enligt uppfinningen, för lipasvariant I kan kombineras med vilka andra modifieringar som helst som nämnts ovan eller vilka andra modifieringar som helst för varianterna II och III beskrivna i WO 92/05249.

35 Förfarande för framställning av lipasvarianter enligt uppfinningen

Flera metoder för introducering av mutationer i gener är kända inom teknikområdet. Efter en kort diskussion

beträffande kloning av lipaskodande DNA-sekvenser kommer metoder för generering av mutationer vid specifika säten i den lipaskodande sekvensen att diskuteras.

5 Kloning av en DNA-sekvens som kodar för ett lipas

DNA-sekvensen som kodar för ett moderlipas kan isoleras från vilken cell eller mikroorganism som helst, som framställer lipaset ifråga, genom olika metoder väl kända inom teknikområdet. Till att börja med bör genomiskt DNA och/eller cDNA-bibliotek framställas under användning av kromosomalt DNA eller budbärar-RNA från organismen som framställer lipaset som skall studeras. Sedan kan, om aminosyrasekvensen för lipaset ifråga är känd, homologa märkta oligonukleotidsonder syntetiseras och användas för 10 identifiering av lipaskodande kloner från ett genomiskt bibliotek av bakteriellt DNA eller från ett fungalt cDNA-bibliotek. Alternativt kan en märkt oligonukleotidsond innehållande sekvenser som är homologa med lipas från annan bakterie- eller fungusstam användas som en sond för 15 identifiering av lipaskodande kloner, varvid hybridisering- och tvättförhållanden av lägre stringens används.

Ytterligare en metod för identifiering av lipasproducerande kloner innefattar insättning av genomiska DNA-fragment i en expressionsvektor, såsom en plasmid, transformation av lipasnegativa bakterier med det resulterande 25 genomiska DNA-biblioteket och sedan utspridning av de transformerade bakterierna på agar innehållande ett substrat för lipas. Sådana bakterier som innehåller lipasbärande plasmid framställer kolonier omgivna av en halo av klart agar, vilket beror på nedbrytning av substratet av 30 utsöndrat lipas.

Alternativt kan DNA-sekvensen som kodar för enzymet framställas syntetiskt genom etablerade standardmetoder, t.ex. fosfoamiditmetoden som beskrivs av S.L. Beaucage och M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, sid. 35 1859-1869, eller metoden som beskrivs av Matthes et al., The EMBO J. 3, 1984, sid. 801-805. Enligt fosfoamiditme-

toden framställs oligonukleotider, t.ex. i en automatiserad DNA-syntetisör, vilka renas, hybridiseras, ligeras och klonas i lämpliga vektorer. Slutligen kan DNA-sekvensen vara av blandat genomiskt och syntetiskt ursprung, av
5 blandat syntetiskt och cDNA ursprung eller av blandat genomiskt och cDNA ursprung, vilken framställts genom ligation av syntetiska, genomiska eller cDNA fragment (beroende på vad som är önskvärt), varvid fragmenten motsvarar olika delar av hela DNA-sekvensen, i enlighet med standardmetoder. DNA-sekvensen kan också framställas genom en
10 polymeraskedjereaktion (PCR) med hjälp av specifika primers, såsom beskrivs i US 4 683 202 eller R.K. Saiki et al., Science 239, 11988, sid. 487-491.

15 Sätesriktad mutagenes för den lipaskodande sekvensen

När en lipaskodande DNA-sekvens har isolerats och önskvärda säten för mutation identifierats, kan mutationer introduceras med hjälp av syntetiska oligonukleotider. Dessa oligonukleotider innehåller nukleotidsekvenser
20 som flankerar de önskade mutationssätena; mutanta nukleotider sätts in under oligonukleotidsyntes. I en specifik metod framställs ett enkelsträngat DNA-gap, som överbrygar den lipaskodande sekvensen, i en vektor som bär lipasgenen. Sedan hybridiseras den syntetiska nukleotiden,
25 som bär den önskade mutationen, till en homolog del av det enkelsträngade DNA:t. Det återstående gapet fylls sedan igen med DNA-polymeras I (Klenow-fragment) och konstruktionen ligeras med hjälp av T4-ligas. Ett specifikt exempel på denna metod beskrivs i Morinaga et al., (1984, Biotechnology 2:646-639). US-patentet 4 760 025 av Estell
30 et al., beviljat den 26 juli 1988, avslöjar introduktion av oligonukleotider, som kodar för multipla mutationer, genom utförande av mindre ändringar i kassetten. Emellertid kan ett till och med större mångfald mutationer
35 introduceras vid vilken tidpunkt som helst genom Morinaga-metoden, eftersom ett mångfald oligonukleotider av varierande längder kan introduceras.

En annan metod för introducering av mutationer i lipaskodande sekvenser beskrivs i Nelson och Long, Analytical Biochemistry 180, 1989, sid. 147-151. Den involverar den 3-stegsmetod där ett PCR-fragment genereras, vilket
5 innehåller den önskade mutationen introducerad genom användning av en kemiskt syntetiserad DNA-sträng som en av ifrågavarande primers i PCR-reaktionerna. Från det PCR-genererade fragmentet kan ett DNA-fragment bärande mutationen isoleras genom klyvning med restriktionsendonukle-
10 aser och därefter återinsättas i en expressionsplasmid (se också Fig. 3 och 4 där denna metod beskrivs ytterligare).

Expression av lipasvarianter

15 Enligt uppfinningen kan en muterad lipaskodande sekvens, som är framställd genom metoder som beskrivits ovan eller genom vilken alternativ metod som helst känd inom teknikområdet, uttryckas i enzymform under användning av en expressionsvektor som typiskt innefattar reglersekvenser som kodar för en promotor, operator, ribosombind-
20 ningssäte, translationsinitieringssignal och eventuellt en repressorgen eller olika aktivatorgener. För att möjliggöra utsöndringen av det uttryckta proteinet kan nukleotider som kodar för en "signalsekvens" sättas in före
25 den lipaskodande sekvensen. För expression under ledning av reglersekvenser, kopplas en målgen som skall behandlas enligt uppfinningen manövrerbart till reglersekvenserna i den rätta läsramen. Promotorsekvenser som kan sättas in i plasmidvektorer och kan stödja eller underlätta tran-
30 skriptionen av den mutanta lipasgenen innefattar men begränsas inte till den prokaryota β -laktamaspromotorn (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731) och tac-promotorn (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25). Ytterligare hänvis-
35 ningar kan också hittas i "Useful proteins from recombinant bacteria" i Scientific American, 1980, 242:74-94.

Enligt en utföringsform transformeras *B. subtilis* med en expressionsvektor bärande det muterade DNA:t. Om expression skall äga rum i en utsöndrande mikroorganism, såsom *B. subtilis*, kan en signalsekvens följa translationsinitieringssignalen och föregå den intressanta DNA-sekvensen. Signalsekvensen verkar då för att transportera expressionsprodukten till cellväggen där den klyvs från produkten vid utsöndring. Såsom uttrycket "reglersekvenser" definieras ovan avser det att innefatta en signal-sekvens, då sådan förekommer.

I ett för närvarande föredraget förfarande för framställning av lipasvarianter enligt uppfinningen används en trådformig fungus som värdorganism. Ifrågavarande trådformiga fungus-värdorganism kan lämpligen vara en sådan som tidigare använts som värd för framställning av rekombinanta proteiner, t.ex. en stam av *Aspergillus* sp., såsom *A. niger*, *A. nidulans* eller *A. oryzae*. Användning av *A. oryzae* vid framställningen av rekombinanta proteiner beskrivs utförligt i t.ex. EP 238 023.

För expression av lipasvarianter i *Aspergillus* föregås DNA-sekvensen som kodar för lipasvarianten av en promotor. Ifrågavarande promotor kan vara vilken DNA-sekvens som helst som har en större transkriptionell aktivitet i *Aspergillus* och kan erhållas från en gen som kodar för ett extracellulärt eller intracellulärt protein, såsom ett amylas, ett glukamylas, ett proteas, ett lipas, ett cellulasa eller ett glykolytiskt enzym.

Exempel på lämpliga promotorer är sådana erhållna från gener som kodar för *A. oryzae* TAKA-amylas, *Rhizomucor miehei*-aspartanproteinas, *A. niger* neutral α -amylas, *A. niger* syrastabil α -amylas, *A. niger*-glukamylas, *Rhizomucor miehei*-lipas, *A. oryzae* alkalisk proteas eller *A. oryzae*-triosfosfatisomeras.

Speciellt när värdorganismen är *A. oryzae* är en föredragen promotor för användning i förfarandet enligt föreliggande uppfinning *A. oryzae* TAKA-amylaspromotorn eftersom den uppvisar en större transkriptionell aktivitet

i *A. oryzae*. Sekvensen för ifrågavarande TAKA-amylaspromotor visas i EP 238 023.

Terminerings- och polyadenyleringssekvenser kan lämpligen erhållas från samma källor som promotorn.

- 5 Metoderna som används för transformation av en fungal värdcell kan lämpligen utföras såsom beskrivs i EP 238 023.

- För att försäkra sig om utsöndring av lipasvarianten från värdcellen kan man se till att DNA-sekvensen som kodar för lipasvarianten föregås av en signalsekvens, som kan vara en naturligt förekommande signalsekvens eller en funktionell del därav eller en syntetisk sekvens som åstadkommer utsöndring av proteinet från cellen. Speciellt kan signalsekvensen erhållas från en gen som kodar för ett *Aspergillus* sp.-amylas eller ett -glukoamylas, en gen som kodar för ett *Rhizomucor miehei*-lipas eller ett -proteas, eller en gen som kodar för ett *Humicola*-cellulas, ett -xylanas eller ett -lipas. Signalsekvensen erhålls företrädesvis från genen som kodar för *A. oryzae* TAKA amylas, *A. niger* neutral α -amylas eller *A. niger* syrastabil α -amylas eller *A. niger* glukoamylas.
- 10
15
20

- Mediet som används för odling av de transformerade värdcellerna kan vara vilket traditionellt medium som helst vilket är lämpligt för tillväxt av *Aspergillus*-celler. Transformanterna är vanligtvis stabila och kan odlas i frånvaro av selektionstryck. Om transformanterna visar sig vara instabila kan emellertid en selektionsmarkör, vilken är introducerad i cellerna, användas för selektion.
- 25

- Det mogna lipasproteinet, som utsöndrats från värdcellerna, kan lämpligen utvinnas från odlingsmediet genom välkända metoder innefattande separation av cellerna från mediet genom centrifugering eller filtrering och utfällning av proteinbaserade komponenter från mediet med hjälp av ett salt, såsom ammoniumsulfat, följt av kromatografiska procedurer, såsom jonbyteskromatografi, affinitetskromatografi eller liknande.
- 30
35

Föreliggande uppfinning hänför sig också till en detergenttillsats innefattande en lipasvariant enligt uppfinningen, företrädesvis i form av ett granulat som inte dammar, en stabiliserad vätska eller ett skyddat enzym.

5 Granulat som inte dammar kan framställas t.ex. enligt US 4 106 991 och US 4 661 452 (båda i namnet Novo Industri A/S) och kan eventuellt beläggas med hjälp av förfaranden som är kända inom området. Flytande enzymberedningar kan exempelvis stabiliseras genom tillsats av en polyol, såsom propylenglykol, ett socker eller en sockeralkohol, mjölksyra eller borsyra enligt etablerade metoder. Andra enzymstabilisatorer är väl kända inom teknikområdet. Skyddade enzymer kan framställas enligt metoden som avslöjas i EP 238 216.

15 Detergenttillsatsen kan lämpligen innehålla 0,02-200 mg enzymprotein per gram tillsats. Det förstås att detergenttillsatsen dessutom kan innefatta en eller flera andra enzymer, såsom ett proteas, cellulas, peroxidas eller amylas, som traditionellt innefattas i detergenttillsatser.

20 Enligt ytterligare en aspekt hänför sig uppfinningen till en detergentkomposition innefattande en lipasvariant enligt uppfinningen. Detergentkompositioner enligt uppfinningen innefattar dessutom ytaktiva ämnen vilka kan vara av anjonisk, icke-jonisk, katjonisk, amfotär eller zwitterjonisk typ samt blandningar av dessa klasser av ytaktiva ämnen. Typiska exempel på lämpliga ytaktiva ämnen är linjära alkylbensensulfonater (LAS), alfa-olefin-sulfonater (AOS), alkoholetoxisulfater (AEOS), alkoholetoxylater (AEO), alkylsulfater (AS), alkylpolyglykosider (APG) och alkalimetallsalter av naturliga fettsyror.

30 Detergentkompositioner enligt uppfinningen kan innehålla andra detergentkomponenter kända inom området, som t.ex. builders, blekningsmedel, blekaktivatorer, antikorrosionsmedel, sekvestrerande medel, medel som förhindrar återutfällning av smuts, parfymer, enzymstabilisatorer etc.

Detergentkompositionen enligt uppfinningen kan beredas i vilken lämplig form som helst, t.ex. som ett pulver eller en vätska. Enzymet kan stabiliseras i en vätskedetergent genom inneslutning av enzymstabilisatorer, såsom har omtalats ovan. Vanligtvis är pH för en lösning av detergentkompositionen enligt uppfinningen mellan 7 och 12 och i vissa fall mellan 7,0 och 10,5. Andra detergentenzymer, såsom proteaser, cellulaser, peroxidaser eller amylaser, kan innefattas i detergentkompositionerna enligt uppfinningen, vilka är antingen åtskilda eller i en kombinerad tillsats som beskrivits ovan.

KORT BESKRIVNING AV RITNINGARNA

Föreliggande uppfinning beskrivs i följande text med hänvisning till de bilagda ritningarna, på vilka:

Fig. 1A och B är datormodeller som visar den tredimensionella strukturen för lipidkontaktzonen för H. lanuginosa-lipaset när lipaset är i inaktiv (A) respektive i aktiv (B) form. "Vita" rester avser hydrofoba aminosyror (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly och Met), "gula" rester avser hydrofila aminosyror (Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr och Cys), "blå" rester avser positivt laddade aminosyror (Lys, Arg och His), och "röda" rester avser negativt laddade aminosyror (Glu och Asp);

Fig. 2A och 2B är datormodeller som visar den tredimensionella strukturen för lipidkontaktzonen av Rh. miehei-lipaset när lipaset är i inaktiv (A) respektive i aktiv (B) form. "Vita" rester avser hydrofoba aminosyror (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly och Met), "gula" rester avser hydrofila aminosyror (Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr och Cys), "blå" rester avser positivt laddade aminosyror (Lys, Arg och His), och "röda" rester avser negativt laddade aminosyror (Glu och Asp);

Fig. 3 är en schematisk framställning av framställning av plasmider, som kodar för lipasvarianter, genom användning av polymeraskedjereaktion (PCR);

Fig. 4 är en schematisk framställning av tre-steps-mutagenes genom PCR;

Fig. 5 visar en restriktionskarta över plasmid pA01;

Fig. 6 visar en restriktionskarta över pAHL; och

5 Fig. 7 visar en restriktionskarta över plasmid pARML.

Föreliggande uppfinning belyses ytterligare i följande exempel vilka inte är avsedda att på något sätt begränsa skyddsomfånget för uppfinningen såsom detta är definierat i patentkraven.

10

ALLMÄNNA METODER

Expression av *Humicola lanuginosa*-lipas och *Rhizomucor miehei*-lipas i *Aspergillus oryzae*

15 Kloning av *Humicola lanuginosa*-lipas och *Rhizomucor miehei*-lipas beskrivs i EP 305 216 respektive EP 238 023. Dessa patentpublikationer beskriver också expression och karakterisering av de två lipaserna i *Aspergillus oryzae*. De två använda expressionsplasmiderna benämns p960 (vilken bär *H. lanuginosa*-lipasgenen) och p787 (vilken bär *R. miehei*-lipasgenen).

20

Expressionsplasmiderna som används i denna ansökan är identiska med p787 och p960 förutom mindre ändringar omedelbart 3' om de lipaskodande regionerna. Modifieringarna gjordes på följande sätt: p960 spjälkades med restriktionsenzymerna *NruI* och *BamHI*. Mellan dessa två säten klonades *BamHI*/*NheI*-fragmentet från plasmiden pBR322, varvid *NheI*-fragmentet fylldes i med Klenow-polymeras och plasmiden pA01 (Fig. 5) upprättades, vilken innehåller unika *BamHI*- och *NheI*-säten. Mellan dessa unika säten klonades *BamHI*/*XbaI*-fragment från p960 och p787 för att ge pAHL (Fig. 6) och pARML (Fig. 7).

25

30

Sätesriktad *in vitro*-mutagenes i lipasgener:

35 Tre olika metoder användes för introducering av mutationer i lipasgenerna. En utnyttjad metod var oligonukleotidsätesriktad mutagenes vilken beskrivs av Zoller &

Smith, DNA, vol. 3, nr 6, 479-488 (1984). Metoden beskrivs kortfattat i följande text och beskrivs ingående i exempel 1.

Efter isolering från expressionsplasmiden sätts den intressanta lipasgenen in i en cirkulär bakteriofag M13-vektor. En kemiskt syntetiserad komplementär DNA-sträng hybridiseras till det enkelsträngade genomet. Denna DNA-sträng innehåller mutationen som skall introduceras, vilken är flankerad av sekvenser komplementära till lipas-
5 sekvenser på det cirkulära DNA:t. In vitro förlängs sedan ifrågavarande primer biokemiskt längs hela det cirkulära genomets längd med hjälp av Klenow-polymeras. Vid transformation i E. coli ger heteroduplexet upphov till dubbelsträngat DNA med den önskade sekvensen, från vilken
10 ett fragment kan isoleras och återinsättas i expressionsplasmiden.

En annan använd metod beskrivs i Nelsen & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989). Den involverar 3-stegsmetoden för generering av ett PCR (polymeras kedjereaktion)-fragment, vilket innehåller den önskade mutationen introducerad genom användning av en kemiskt syntetiserad DNA-sträng som en av de ifrågavarande primers i PCR-reaktionerna. Från det PCR-genererade fragmentet kan ett DNA-fragment som bär mutationen isoleras genom klyvning med restriktionsenzymer och därefter återinsättas i
20 expressionsplasmiden. Denna metod beskrivs ingående i exempel 3. I Figur 3 och 4 beskrivs metoden ytterligare.

I ytterligare en metod, som vanligen benämns "kassettmutagenes", ersätts ett segment mellan två restriktionssäten av den lipaskodande regionen med ett syntetiskt DNA-fragment som bär den önskade mutationen.
30

Exempel 1: Framställning av en plasmid som uttrycker D96L-varianten av Humicola lanuginosa-lipas

35 **Isolering av lipasgenen**

Expressionsplasmiden p960 innehåller den kodande regionen för Humicola lanuginosa-lipas på ett BamHI/XbaI-

restriktionsfragment (DNA- och aminosyrasekvensen för lipaset visas i bifogad sekvenslista ID nr 1). BamHI/XbaI-fragmentet isolerades enligt följande: Expressionsplasmiden inkuberades med restriktionsendonukleaserna BamHI och XbaI. Förhållandena var följande: 5 µg plasmid, 10 enheter BamHI, 10 enheter XbaI, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂ och 1 mM DTT i en volym av 50 µl. Temperaturen var 37°C och reaktionstiden 2 timmar. De två fragmenten separerades på en 1% agarosgel och det önskade fragmentet isolerades från gelen.

Ligering till vektorn M13mp18

Den bakteriofaga vektorn M13mp18 spjälkades med BamHI och XbaI i sin dubbelsträngade, replikativa form under förhållanden som beskrivits ovan. Det isolerade restriktionsfragmentet ligerades till den spjälkade bakteriofagvektorn i följande reaktionsblandning: 0,2 µg fragment, 0,02 µg vektor, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT och 1 mM ATP i en volym av 20 µl vid 16°C i 3 timmar. 5 µl av denna blandning transformerades i E. coli-stammen JM101. Förekomsten av fragment i vektorn identifierades genom restriktionsenzymanalys på dubbelsträngat M13-DNA isolerat från transformanterna.

25 Isolering av enkelsträngat (ss) DNA (mall)

Från transformanten som beskrivits ovan isolerades ss-DNA enligt en metod beskriven av Messing i Gene, 19, 269-276 (1982).

30 5' fosforylering på mutageniseringsprimern

Mutageniseringsprimern med sekvensen 5'-TTTCTTTCA-ACAAGAAGTTAAGA-3' fosforylerades vid 5'-ändan i en 30 µl reaktionsblandning innehållande 70 mM Tris-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP, 100 pmol oligonukleotid och 3,6 enheter T4-polynukleotidkinas. Reaktionen utfördes i 30 minuter vid 37°C. Sedan inaktiverades enzymet genom inkubation av blandningen i 10 minuter vid 65°C.

Hybridisering av mall och fosforylerad mutageniseringsprimer

Hybridisering av mall och primer utfördes i en volym
5 av 10 µl innehållande 0,5 pmol mall, 5 pmol primer, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl och 1 mM DTT genom värmning i 65°C i 10 minuter och därefter nedkylning till 0°C.

10 Förlängnings-/ligeringsreaktion

Till reaktionsblandningen ovan sattes 10 µl av följande blandning: 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 0,3 mM dGTP, 0,3 mM TTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 3 enheter T4-DNA-ligas och 2,5 enheter
15 Klenow-polymeras. Sedan genomfördes reaktionen i 16 timmar vid 16°C.

Transformation av JM101

Reaktionsblandningen ovan transformerades i olika
20 utspädningar av CaCl₂-behandlade E. coli JM101-celler med hjälp av standardmetoder och ströks därefter ut på 2 x YT-toppgagar på 2 x YT-agarplattor. (2 x YT = trypton 16 g/l, jästextrakt 10 g/l, NaCl 5 g/l. 2 x YT-toppgagar = 2 x YT med 0,4% agaros och dessutom autoklaverad. 2 x YT-
25 agarplattor = 2 x YT med 2% agar och dessutom autoklaverad). Plattorna inkuberades vid 37°C över natten.

Identifiering av positiva kloner

Den använda metoden var plack-hybridisering på membranfilter, vilket beskrivs i följande text: ett nitrocellulosafilter placerades på en platta med en lämplig plackdensitet så att filtret blev vått. Filtret badades sedan i följande lösningar: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH i 30
30 sek., 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 i 1 minut och 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M natriumcitrat) fram till senare användning. Filtret torkades på 3 mm filterpapper och
35 värmdes i 2 timmar vid 80°C i en vakuumugn.

Mutageniseringsprimern med sekvensen 5'-TTCTTTCAACA-AGAAGTTAAGA-3' märktes radioaktivt vid 5'-änden i en volym av 30 µl innehållande 70 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10 pmol oligonukleotid, 20 pmol γ-32P-ATP och 3,5 enheter T4-polynukleotidkinas. Blandningen inkuberades vid 37°C i 30 minuter och sedan i 5 minuter vid 100°C.

Det torkade filtret förhybridiserades i 2 timmar vid 65°C i 6 x SSC, 0,2% bovint serumalbumin, 0,2% Ficoll, 0,2% polyvinylpyrrolidon, 0,2% natriumdodecylsulfat (SDS) och 50 µg/ml sonikerat DNA från laxsperma. Sedan sattes reaktionsblandningen som innehöll den märkta sonden till 15 ml nyligen förhybridiserad blandning och filtret badades häri över natten vid 27°C under försiktig omskakning. Efter hybridisering tvättades filtret 3 gånger var 15:e minut i 2 x SSC, 0,1% SDS och därefter autoradiograferades filtret. Efter tvätt i samma lösning, men nu vid 50°C, och ytterligare en autoradiografi, identifierades placker innehållande DNA-sekvenser komplementära till ifrågavarande mutageniseringsprimer.

Eftersom den identifierade klonen är ett resultat från en heteroduplex ströks placket ut igen. Hybridiserings- och identifieringsstegen upprepades.

25 **Rening av dubbelsträngat M13-fag DNA**

En omselekterad klon användes för infektion av E. colistam JM101. En odling innehållande approximativt 10⁸ fager och 5 kolonier JM101 tilläts växa i 5 timmar i 5 ml 2 x YT-medium vid 37°C. Sedan renades dubbelsträngat, cirkulärt DNA från pelleten enligt en metod beskriven av Birnboim & Doly, Nucleic Acids Res., 1513 (1979).

Isolering av ett restriktionsfragment som kodar för modifierat lipas

35 DNA-beredningen (ca 5 µg) som isolerades ovan spjälkades med 10 enheter av vart och ett av restriktionsendonukleaserna BamHI och XbaI i 60 µl av 100 mM NaCl, 50 mM

Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂ och 10 mM DTT i 2 timmar vid 37°C. DNA-produkterna separerades på en agarosgel och fragmentet renades från gelen.

5 **Ligering till Aspergillus expressionsvektorn pA01 (Figur 5)**

Det isolerade restriktionsfragmentet ligerades till Aspergillus-vektorn pA01 spjäldad med restriktionsenzymerna BamHI och NheI i följande reaktionsblandning: 0,2
10 µg fragment, 0,02 µg vektor, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP i en total volym av 20 µl. 5 µl av denna reaktionsblandning användes för transformation av E. colistam MC1061, i vilken den modifierade expressionsplasmiden identifierades och propagerades. Plas-
15 miden benämndes pAHL96L och är identisk med pAHL förutom det modifierade kodonet.

Sekvensverifiering av pAHL96L

Den mutageniserade plasmiden sekvenserades direkt på
20 den dubbelsträngade plasmiden med hjälp av dideoxikedje-termineringsmetoden som ursprungligen beskrevs av Sanger.

Exempel 2: Framställning av plasmider som uttrycker andra Humicola-lipasvarianter

25 Andra mutanta lipasgener framställdes med hjälp av samma metod som beskrevs i Exempel 1. Plasmidnamn och primers som används i modifieringarna anges nedan.

30

35

	<u>Plasmidnamn</u>	<u>Primersekvens</u>
	pAHL96N	5'-TCTTTCAAGTTGAAGTTAAGA-3'
	pAHL111N	5'-GTGAAGCCGTTATGTCCCCTG-3'
	pAHLE87Q	5'-CGATCCAGTTTTGTATGGAACGA-3'
5	pAHLR209A/E210A	5'-GCTGTAACCGAAAGCAGCCGGCGGGAGTCT-3'
	pAHLE87A	5'-CGATCCAGTTAGCTATGGAACG-3'
	pAHLE56A	5'-CTCCAGAGTCAGCAAACGAGTA-3'
	pAHLE56Q	5'-CCAGAGTCTTGAAACGAGTAG-3'
	pAHL111L	5'-AAGTGAAGCCCAAATGTCCCCTG-3'
10	pAHLE210A	5'-TGTAACCGAAAGCGCGGGCGG-3'
	pAHLE210Q	5'-TAACCGAATTGGCGGGCGGG-3'
	pAHLR209A	5'-AACCGAATTCAGCCGGCGGGAGT-3'

Exempel 3: Framställning av en plasmid som uttrycker

15 D254N-varianten av Humicola lanuginosa-lipas

Linjärisering av plasmid pAHL

Den cirkulära plasmiden pAHL linjäriserades med restriktionsenzymet SphI i en volym av 50 µl av följande reaktionsblandning: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 20 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotritol, 1 µg plasmid och 2 enheter SphI. Spjälkningen utfördes i 2 timmar vid 37°C. Reaktionsblandningen extraherades med fenol (bringad i jämvikt med Tris-HCl, pH 7,5) och fälldes ut genom tillsats av 2 volymer iskall 96% etanol. Efter centrifugering och 25 torkning av pelleten upplöstes ifrågavarande linjäriserade DNA i 50 µl H₂O och koncentrationen uppskattades på en agarosgel.

PCR-mutagenes i 3 steg

30 3-stegs mutagenesering involverar användning av fyra primers, vilket visas i Figur 4:

Mutageniseringsprimer (=A): 5'GTGCGCAGGGATGTTCCGAAT-GTTAGG-3'

35 PCR-hjälpare 1 (=B): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGACCCTCTAC-CTATTAAATCGGC-3'

PCR-hjälpare 2 (=C): 5'-CCATGGCTTTCACGGTGTCT-3'

PCR-handtag (=D): 5'-GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

Alla 3 stegen utfördes i följande buffert innehållande: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% gelatin, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM TTP, 2,5 enheter Taq-polymeras.

I steg 1 sattes 100 pmol primer A, 100 pmol primer B och 1 fmol linjäriserad plasmid till en total volym på 100 µl reaktionsblandning och 15 cykler, varvid varje cykel bestod av 2 minuter vid 95°C, 2 minuter vid 37°C och 3 minuter vid 72°C, genomfördes.

Koncentrationen av PCR-produkten uppskattades på en agarosgel. Sedan genomfördes steg 2. 0,6 pmol steg 1-produkt och en 1 fmol linjäriserad plasmid innefattades i en total volym 100 µl av tidigare nämnda buffert och 1 cykel, vilken bestod av 5 minuter vid 95°C, 2 minuter vid 37°C och 10 minuter vid 72°C, genomfördes.

Till steg 2-reaktionsblandningen sattes 100 pmol primer C och 100 pmol primer D (1 µl av varje) och 20 cykler, varvid varje cykel bestod av 2 minuter vid 95°C, 2 minuter vid 37°C och 3 minuter vid 72°C, genomfördes. Denna behandling omfattade steg 3 i mutageniseringsproceduren.

Isolering av muterat restriktionsfragment

Produkten från steg 3 isolerades från en agarosgel och återupplöstes i 20 µl H₂O. Sedan spjälkades den med restriktionsenzymet BspMII i en total volym av 50 µl med följande sammansättning: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT och 10 enheter BspMII. Inkubation utfördes vid 37°C i 2 timmar. Ifrågavarande 264 bp BspMIII-fragment isolerades från en agarosgel.

Ligering till expressionsvektor pAHL

Expressionsplasmiden pAHL klyvdes med BspMII under förhållanden som beskrivits ovan och det stora fragmentet isolerades från en agarosgel. Till denna vektor ligerades det muterade fragmentet isolerat ovan och ligeringsbland-

ningen användes för transformation av *E. coli*. Förekomsten och orienteringen av fragmentet verifierades genom klyvning av en plasmidberedning från en transformant med restriktionsenzymer. Sekvensanalys genomfördes på den dubbelsträngade plasmiden med hjälp av dideoxikjedtermineringsmetoden som utvecklats av Sanger. Plasmiden benämndes pAHL254N och är identisk med pAHL, förutom det ändrade kodonet.

10 Exempel 4: Framställning av plasmider som uttrycker andra *Humicola lipas*-varianter

Följande mutanter framställdes med hjälp av samma metod som beskrevs i Exempel 3, förutom att andra restriktionsenzymer användes för spjälkning av PCR-produkten och annan vektor för omkloning av det muterade fragmentet användes. Plasmidnamn och primers som användes för modifieringarna anges nedan.

	<u>Plasmidnamn</u>	<u>Primer A-sekvens</u>
20	pAHL254K	5'-GTGCGCAGGGATCTTCGGAATGTT-3'
	pAHL254R	5'-GTGCGCAGGGATTCTCGGAATGTT-3'
	pAHL242N	5'-GCCGCCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'
	pAHL242N/D254N	5'-GTGCGCAGGGATGTTTCGGAATGTTAGGCTGGTTATTGCCG- CCGGTGGCGTTGATGCCTTCTAT-3'
25	pAHLE87R	5'-CCCGATCCAGTTTCTTATCGATCGAGAGCCGCGG-3'
	pAHLE87K	5'-CGATCCAGTTCTTTATCGATCGAGAGCCACGG-3'

Exempel 5: Framställning av lipasvarianter genom kombination av tillgängliga mutanter

Följande mutanter framställdes genom kombination av plasmidfragment från mutanter som framställt ovan. Exempelvis framställdes pAHLE87K/D254K genom isolering av ifrågavarande BamHI/BstXI-restriktionsfragment från pAHLE87K och därefter insättning av fragmentet i pAHL254K spjälkad med BamHI och BstXI:

35

Plasmid
pAHLE87K/D254K

pAHLE87Q/D254N/D242/E210Q
pAHLE87Q/D242N/E210Q
pAHLR209A/E210A/D96L
pAHLR209A/E210Q/E56Q
5 pAHLE210Q/D242N/D254N
pAHLE87Q/E210Q/D242N

Exempel 6

Transformation av *Aspargillus oryzae* (allmän metod)

10 100 ml YPD (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) inokulerades med sporer från *A. oryzae* och inkuberades under omskakning i ca 24 timmar. Ifrågavarande mycel skördades genom filtrering genom en miraduk och tvättades med 200 ml 0,6
15 M MgSO_4 . Ifrågavarande mycel suspenderades i 15 ml 1,2 M MgSO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , pH = 5,8. Suspensionen kylades på is och 1 ml buffert innehållande 120 mg Novozym® 234, sats 1687, tillsattes. Efter 5 minuter tillsattes 1 ml 12 mg/ml BSA (sigma typ H25) och inkubation under försiktig
20 omrörning fortsatte i 1,5 - 2,5 timmar vid 37°C tills att ett stort antal protoplaster var synliga i ett prov inspekterat under mikroskop.

Suspensionen filtrerades genom miraduken, varefter filtratet fördes över till ett sterilt rör och täcktes
25 med 5 ml 0,6 M sorbitol, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,0. Centrifugering utfördes i 15 minuter vid 1000 g och protoplasterna uppsamlades från den övre delen av MgSO_4 -bädden. 2 volymer STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl_2) sattes till protoplastsuspensionen och
30 blandningen centrifugerades i 5 minuter vid 1000 g. Protoplastpelleten resuspenderades i 3 ml STC och ompelletes. Detta upprepades. Slutligen resuspenderades protoplasterna i 0,2 - 1 ml STC.

100 µl protoplastsuspension blandades med 5- 25 µg
35 p3SR2 (en *A. nidulans* amdS-gen bärande den plasmid som beskrivs i Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., vol. 3, nr 8, 1430-1439, augusti 1983) i 10 µl STC. Blandningen läm-

nades vid rumstemperatur i 25 min. 0,2 ml 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl_2 och 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5 tillsattes och försiktigt omblandning genomfördes (två gånger) och slutligen tillsattes 0,85 ml av samma lösning och försiktig omblandning genomfördes. Blandningen lämnades i rumstemperatur i 25 minuter, centrifugerades vid 2 500 g i 15 minuter och pelleten resuspenderades i 2 ml 1,2 M sorbitol. Efter ytterligare en sedimentering spreds protoplasterna ut på minimala plattor (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) innehållande 1,0 M sackaros, pH = 7,0, 10 mM acetamid som kvävekälla och 20 mM CsCl för inhibering av bakgrundstillväxt. Efter inkubation i 4 - 7 dagar vid 37°C plockades sporer, vilka suspenderades i sterilt vatten och spreds ut för erhållande av enstaka kolonier. Denna procedur upprepades och sporer från en enstaka koloni efter den andra omisoleringen bevarades som en definierad transformant.

Exempel 7

20 Expression av lipasvarianten D96L i *A. oryzae*

pAHL96L transformerades i *A. oryzae* IFO 4177 genom samtransformation med p3SR2 innehållande amdS-genen från *A. nidulans* som beskrivs i Exempel 15. Protoplaster framställda som beskrivits inkuberades med en blandning av 25 lika mängder pAHL96L och p3SR2, varvid approximativt 5 µg av var och en användes. 9 transformanter som kunde använda acetamid som enda kvävekälla omisolerades två gånger. Efter tillväxt på YPD i tre dagar analyserades odlingssupernatanter med hjälp av analysen för lipasaktivitet som beskrivs i exempel 16 (Rening av lipasvarianter enligt uppfinningen). Den bästa transformanten selekterades för ytterligare studier och tilläts växa i en 1-liters skakflaska med 200 ml FG4-medium (3% sojamjöl, 3% maltodextrin, 1% pepton, vilket justerats till pH 7,0 med 30 4 M NaOH) i 4 dagar vid 30°C. Under dessa förhållanden åstadkom transformanten ca 500 lipasenheter per ml odling.

De andra lipasvarianterna framställdes väsentligen såsom beskrivits ovan, varvid den allmänna metoden som beskrivits i Exempel 6 användes.

5 Exempel 8

Rening av lipasvarianter enligt uppfinningen

Analys av lipasaktivitet:

Ett substrat för lipas framställdes genom emulgering av glyceroltributyrat (MERCK) med hjälp av arabiskt gummi
10 som emulgator. Lipasaktivitet analyserades vid pH 7 med hjälp av en statisk pH-metod. En enhet lipasaktivitet (LU/mg) definierades som den mängd som krävdes för att frigöra en mikromol fettsyra per minut.

Steg 1: Centrifugera fermenteringssupernatanten,
15 kasta fällningen. Justera pH för supernatanten till 7 och tillsätt successivt en lika stor volym kall 96% etanol. Tillåt blandningen stå i 30 minuter i ett isbad. Centrifugera och kasta fällningen.

Steg 2: Jonbyteskromatografi. Filtrera supernatanten
20 och applicera på DEAE-fast flow (Pharmacia TM)-kolonn, vilken bringats i jämvikt med 50 mM tris-acetatbuffert pH 7. Tvätta kolonnen med samma buffert tills att absorption vid 280 nm är mindre än 0,05 OD. Eluera den bundna enzymatiska aktiviteten med en linjär saltgradient i samma
25 buffert (0 till 0,5 M NaCl) med fem kolonnvolym. Slå samman de fraktioner som innehåller enzymatisk aktivitet.

Steg 3: Hydrofobisk kromatografi. Justera molariteten i sammanslagningen som innehåller enzymatisk aktivitet till 0,8 M genom tillsats av fast ammoniumacetat. Ap-
30 plicera enzymet på en TSK-gel Butyl-toyopearl 650 C kolonn (från Tosoh Corporation, Japan), vilken bringats i jämvikt i förväg med 0,8 M ammoniumacetat. Tvätta det obundna materialet med 0,8 M ammoniumacetat och eluera
35 det bundna materialet med destillerat vatten.

Steg 4: Sammanslagning innehållande lipasaktivitet späds med vatten för justering av konduktans till 2 mS

och pH till 7,0. Applicera sammanslagningen på en High performance Q Sepharose (Pharmacia)-kolonn, vilken bringats i jämvikt i förväg med 50 mM trisacetatbuffert pH 7. Eluera det bundna enzymet med en linjär saltgradient.

5

Exempel 9

Tvättningseffekten för lipasvarianter enligt uppfinningen

Tvättningseffekten för lipasvarianter från Humicola Lanuginosa enligt uppfinningen utvärderades i jämförelse med vildtypslipaset från H. lanuginosa med avseende på enzymdosen i mg protein per liter enligt OD₂₈₀.

Tvättförsök genomfördes i 150 ml bägare placerade i ett termostaterat vattenbad. I bägarna genomfördes omrörning med triangulära magnetiska stavar.

15 De experimentella förhållandena var följande:

Metod: 3 cykler med torkning över natten mellan varje cykel

Tvättvätska: 100 ml per bägare

Provbitar: 6 provbitar (3,5 x 3,5 cm) per bägare

20 Textil: 100% bomull, Test Fabrics style #400

Färgämne: Isterflott färgat med sudanrött (0,75 mg färgämne/g isterflott). 6 µl isterflott uppvärmt till 70°C applicerades på mitten av varje provbit. Efter applicering av färgämnet värmdes provbitarna i en ugn vid 75°C i 30 minuter. Provbitarna bevarades sedan över natten vid rumstemperatur före den första tvätten.

25

Detergent:	LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.)	1,17 g/l
30	AEO (Dobanol 25-7)	0,15 g/l
	Natriumtrifosfat	1,25 g/l
	Natriumsulfat	1,00 g/l
	Natriumkarbonat	0,45 g/l
	Natriumsilikat	0,15 g/l

35 pH: 10,2

Lipaskonc.: 0,075, 0,188, 0,375, 0,75 och 2,5 mg lipas protein per liter

Tid: 20 minuter
 Temperatur: 30°C
 Sköljning: 15 minuter i rinnande kranvatten
 Torkning: Över natten vid rumstemperatur (~20°C,
 5 30-50% relativ fuktighet)
 Utvärdering: Efter tredje tvätten mättes reflektansen
 vid 460 nm.

Resultat

Dos-responskurvor jämfördes för lipasvarianterna och
 10 det naturliga lipaset från *H. lanuginosa*. Dos-responskur-
 vor beräknades genom insättning av uppmätta data i följande ekvation:

$$\Delta R = \Delta R_{\max} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

15

där ΔR är effekten uttryckt i reflektansenheter C är
 enzymkoncentrationen (mg/l)

ΔR_{\max} är en konstant som uttrycker den maximala effekten

20

K är en konstant; K^2 uttrycker enzymkoncentrationen där halva den maximala effekten har uppnåtts.

Med avseende på de karaktäristiska konstanterna ΔR_{\max}
 och K som finns för såväl varje lipasvariant som för
 25 vildtypslipaset beräknades förbättringsfaktorer. Förbättringsfaktorn definieras som

$$f_{\text{improve}} = C_{WT}/C \quad (II)$$

30 och uttrycker den mängd lipasvariantprotein som krävs för
 erhållande av samma effekt som den som erhöles med 0,25
 mg/l vildtypsproteinreferens (C_{WT}).

Proceduren för beräkning av förbättringsfaktorn var således följande:

35

1) Effekten för vildtypsprotein vid 0,25 mg/l
 ($\Delta R_{\text{vildtyp}}$) beräknades med hjälp av ekvation (I);

2) Lipasvariantkoncentration som resulterar i samma effekt som vildtypen vid 0,25 mg/l beräknades med hjälp av följande ekvation:

$$C = (K_{(\text{variant})} \frac{\Delta R_{(\text{vildtyp})}}{\Delta R_{\text{max}(\text{variant})} - \Delta R_{(\text{vildtyp})}})^2 \quad (\text{III})$$

3) Förbättringsfaktorn beräknades med hjälp av ekvation (II).

Resultaten visas i Tabell 1 nedan.

10

TABELL 1

Variant	Förbättringsfaktor
D96L	4,4
D111L	1,0
E87A	1,0
E56A	1,6
E56Q	2,6
R209A	1,1
D242N	1,7
R209A+E210A	1,9
R209A+E210A+D96L	2,8
E210Q+D242N+D254N	1,8
R209A+E210A+D96L+E56Q	1,5

25

Från Tabell 1 kan man se att lipasvarianterna R209A+E210A, E56Q och D96L har ett avsevärt förbättrad tvätteffekt jämfört med vildtypslipaset. Detta kan möjligen tillskrivas den minskade negativa laddningen och den ökade hydrofobiciteten hos dessa varianter, vilket resulterar i ökad adsorption under tvättning och således högre aktivitet under torkningsfasen. Effekten för lipasvarianterna E87A, D111L och R209A stämmer överens med den för vildtypsenzymet.

35

Exempel 10**Förbättrad termostabilitet för lipasvarianter**

Termostabiliteten för selekterade varianter från H lanuginosa-lipas har studerats genom differentiell skanningkalorimetri (DSC). Med hjälp av denna metod bestäms den termiska denatureringstemperaturen, **T_d**, genom värmning av en enzymlösning vid en konstant programmerad hastighet.

10 Experiment

En differentiell skanningkalorimeter, MC-2D, från MicroCal Inc. användes för undersökningarna. 50 mM buffertlösningar framställdes vid följande pH-värden: 4 (acetat), 7 (TRIS-acetat), 10 (glycin). Enzymkoncentrationen låg mellan 0,6 och 0,9 mg/ml och en total volym på ca 1,2 ml användes för varje experiment. Alla prover värmdes från 5°C till 95° vid en svephastighet på 90°C/timma.

20 Resultat

Resultaten för vildtypen och de valda mutanterna visas i tabellen nedan.

Nr	Mutation	pH 4		pH 7		pH 10	
		T _d	dT _d	T _d	dT _d	T _d	dT _d
WT	-	58,9	-	74,7	-	69,3	-
1	F211A	60,2	+1,3	75,8	+1,1	70,3	+1,0
2	T267R	59,4	+0,5	75,7	+1,0	70,0	+0,7
3	D111N	58,3	-0,6	75,6	+0,9	69,9	+0,6
4	F211L	57,8	-1,1	74,8	0,1	69,4	0,1

25 Notera: dT_d betecknar förändringen i termostabilitet, vilket är ett resultat av mutationen.

Exempel 11**Lagringsstabilitet för lipasvarianter från *H. lanuginosa* i vätskedetergent**

Flera varianter testades i en provvätskedetergent
5 med följande sammansättning:

		% vikt/vikt
	Anjonisk	LAS 10
		AS 1
10		Tvål 14
	Icke-jonisk	AEO 13
	Lösningsmedel	1,2-propandiol 3
		Etanol 5
	Buffert	TEA 6
15	Builder	Natriumcitrat 1
	Neutraliserings-	
	medel	NaOH 2
	Stabilisatorer etc	SXS 1
20		Ca ²⁺ 0,0025
		Fosfonat 0,4
		Na ₂ SO ₄ 0,2
	Vatten	Sätt till 100%
	pH	8 eller 10

25

1000 LU per gram detergent tillsattes och i vissa
prover tillsattes 0,025 AU/g (Alcalase®). Proverna lagra-
des enligt följande schema (tre prover av varje):

30	Lagringstemperatur:	<u>-18°</u>	<u>30°C</u>
	Detergent		
	pH 8, inget proteas	2 & 7 dagar	2 & 7 dagar
	pH 8, 0,025 AU/g		2 dagar
	pH 10, inget proteas	7 dagar	7 dagar

35

Efter denna inkubation analyserades proverna enligt
LU-metoden (Novo Nordisk AF 95,5).

Under antagande av att lipasaktivitetssönderfall följer en första ordningens kinetik, kan sönderfallshastigheten bestämmas till:

$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

- 5 varvid $A(t)$ är enzymaktiviteten vid tid t , A_0 är den initiala aktiviteten och k är första ordningens hastighetskonstant.

För detergenten som innehåller proteas kan en hastighetskonstant för proteolysen beräknas från

10
$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-[k+k_p] \cdot t)$$

där k_p är hastighetskonstanten för proteolys och där k beräknas från stabilitetsdata bestämda i detergenten utan proteas.

- I varje experiment inkluderades vildtypslipaset från
15 *H. lanuginosa* som en referens och jämförelse mellan varianterna och vildtypen görs endast inom ett experiment för att man ska kunna reducera variationsosäkerheten mellan experimenten. Resultaten anges nedan och den relativa förbättringen hos en variant i förhållande till vildtypen
20 anges som:

$$IF_x = k_{wt}/k_x$$

- där IF står för förbättringsfaktor, k_{wt} är sönderfallshastighetskonstanten för vildtypen (vid givna förhållanden) och k_x är motsvarande hastighetskonstant för varianten
25 ifråga i samma experiment. IF uttrycker den relativa förbättringen som halveringstid ($IF_x = 2$ indikerar att halveringstiden för variant x är två gånger så lång som den för vildtypen i samma experiment). Baserat på en uppskattning av replikatvariationer inom ett experiment be-
30 traktas $IF < 0,7$ eller $IF > 1,3$ som signifikant. Enheten för k är $(\text{dag})^{-1}$.

5	Variant	Experi- ment	pH 8 inget prot. k*) IF*)		pH 8 +Alkalas k _p IF		pH 10 Inget prot. k IF	
			k*)	IF*)	k _p	IF	k	IF
5	Vildtyp	3	0,02		0,48		0,19	
		5	0,02		0,40		0,16	
		6	0,00		0,34		0,09	
		7	0,01		0,52		0,22	
		8 a	0,01		0,50		0,09	
10		b	0,01		0,52		0,07	
10	D96N	3	0,00		0,21	2,3	0,15	1,3
		5	0,02		0,26	1,6	n.d.	
	D111N	3	0,00		0,50	1,0	0,16	1,2
		5	0,02		0,31	1,3	0,13	1,2
		15	0,01		0,22	2,2	0,14	1,4
15	E56Q	3	0,01		0,22	2,2	0,14	1,4
		6	0,01		0,17	2,0	0,08	1,2
	D96L	7	0,00		0,23	2,3	0,09	2,6
		20	0,02		0,36	1,4	0,10	2,3
		20	0,02		0,49	1,0	n.d.	
20	R209A/E210A/- D96L	7	0,02		0,36	1,4	0,10	2,3
		7	0,02		0,49	1,0	n.d.	
	E210Q/D242N/- D254N	7	0,02		0,49	1,0	n.d.	
		7	0,02		0,49	1,0	n.d.	
		7	0,02		0,49	1,0	n.d.	

25 k*) är i detergenten vid pH 8 i alla fall mycket låg, och beroende på den mycket korta lagringstiden (7 dagar, approximativt 90% restaktivitet) bestäms inte värdet speciellt precist. Följaktligen bestäms inte IF.

30 Sammanfattningsvis hade ett antal av de testade varianterna förbättrad resistens mot proteolytisk nedbrytning och nästan alla hade förbättrad resistens mot alkaliska förhållanden.

Exempel 12

Specifik aktivitet

35 Högre specifik aktivitet (antalet substratmolekyler klyvda per enhetstid per enhetsmängd) uppmättes för lipasvarianterna, vilket visas nedan, i jämförelse med vildtypen (wt). Detta betyder att dessa lipaser uppvisar bättre funktion vad beträffar hydrolys av det verkliga
40 substratet.

Lipaserna fermenterades och renades på samma sätt. De renade lipaserna testades i en standard LU-analys (analytisk metod, internt nr från NOVO NORDISK AF 95/6-GB 1991.02.07). Provet analyserades två gånger och medelvärdena redovisas i tabellform. Mängden protein uppskattades genom optiska densitetsmätningar på en Shimadzu-spektrofotometer vid våglängden 280 nm. Provet betraktades som rent när det proportionella värdet för OD280 delat med OD260 var större än 1,6, i kombination med användning av enkelbands SDS-polyakrylamidgelelektrofores.

Humicola lanuginosa	Specifik aktivitet LU/OD280
D111N	4290*
E56A	4890*
L206V	4750
R209*/E210*	6686
R209A/E210A/D96L	4818
wt	3790

* Testades endast en gång

SEKVENSLISTA

(1) ALLMÄN INFORMATION:

- (i) SÖKANDE: Novo Nordisk A/S
- (ii) UPPFININGENS TITEL: Lipasvarianter
- (iii) ANTAL SEKVENSER: 2
- (iv) KORRESPONDENSADRESS:
 - (A) ADDRESSAT: Novo Nordisk A/S
 - (B) GATA: Novo Allé
 - (C) STAD: Bagsvaerd
 - (E) LAND: Denmark
 - (F) POSTNUMMER: 2880
- (v) AV DATOR LÄSBAR FORM:
 - (A) TYP AV MEDIUM: Floppy disk
 - (B) DATOR: IBM PC compatible
 - (C) OPERATIVSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) MJUKVARA: PatentIn Release #1,0, Version #1,2
- (vi) FÖR NÄRVARANDE ANSÖKNINGSINFORMATION:
 - (A) ANSÖKNINGSNUMMER:
 - (B) INLÄMNINGSDATUM:
 - (C) KLASSIFICERING :
- (vii) TIDIGARE ANSÖKNINGSINFORMATION:
 - (A) ANSÖKNINGSNUMMER: DK 2196/90
 - (B) INLÄMNINGSDATUM: 13-SEP-1990
- (vii) TIDIGARE ANSÖKNINGSINFORMATION:
 - (A) INLÄMNINGSDATUM: DK 2194/90
 - (B) INLÄMNINGSDATUM: 13-SEP-1990
- (vii) TIDIGARE ANSÖKNINGSNUMMER:
 - (A) ANSÖKNINGSNUMMER: DK 2195/90
 - (B) INLÄMNINGSDATUM: 13-sep-1990
- (viii) OMBUDSINFORMATION:
 - (A) NAMN: Thalsole-Madsen, Birgit
 - (C) REFERENS/DOCKET: 3520.204-WO
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
 - (A) TELEFON: +45 4444 8888
 - (B) TELEFAX: +45 4449 3256
 - (c) TELEFON: 37304

(2) INFORMATION FÖR SEK ID NR:1

- (i) SEKVENSKSRAKTÄRISTIKA:
 (A) LÄNGD: 918 baspar
 (B) TYP: Nukleinsyra
 (C) STRÄNGTYP: Enkel
 (D) TOPOLOGI: Linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

- (vi) URSPRUNGLIG KÄLLA:
 (A) ORGANISM: *Humicola lanuginosa*

- (ix) SÄRDRAG:
 (A) NAMN/NYCKEL: CDS
 (B) LÄGE: 1..873

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEQ ID NR:1:

ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG	48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu	
1 5 10 15	
GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC	96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe	
20 25 30	
AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT	144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn	
35 40 45	
GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC	192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro	
50 55 60	
GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT	240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser	
65 70 75 80	
GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA	288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys	
85 90 95	
TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC	336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile	

100	105	110	
GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC			384
Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly			
115	120	125	
TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT			432
Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp			
130	135	140	
ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT			480
Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr			
145	150	155	160
CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT GCA TTG GCA ACT GTT			528
Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val			
165	170	175	
GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA			576
Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser			
180	185	190	
TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC			624
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr			
195	200	205	
GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT			672
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile			
210	215	220	
GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA			720
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro			
225	230	235	240
GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT			768
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp			
245	250	255	
ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT			816
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro			
260	265	270	
AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GGG			864
Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly			
275	280	285	
ACA TGT CTT TAGTGGCCGG CGCGGCTGGG TCCGACTCTA GCGAGCTCGA GATCT			918
Thr Cys Leu			

290

(2) INFORMATION FÖR SEK ID NR:2

- (i) SEKVENSKARAKTÄRISTIKA:
 (A) LÄNGD: 291 aminosyror
 (B) TYP: Aminosyra
 (D) TOPOLOGI: Linjär

(ii) MOLEKYLTYP: Protein

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEQ ID NR: 2:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 20 25 30

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 35 40 45

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 50 55 60

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 85 90 95

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
 100 105 110

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
 115 120 125

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 130 135 140

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 145 150 155 160

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 165 170 175

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser

[illegible]

PATENTKRAV

1. Enzymatiskt aktiv lipasvariant av ett moderlipas, vilket moderlipas innefattar en trypsinliknande katalytisk triad innefattande en aktiv serin lokaliserad i en väsentligen hydrofobisk, långsträckt bindningsficka av lipasmolekylen och innefattar en på ytan ej basparad region som täcker den aktiva serinen när lipaset föreligger i inaktiv form, varvid den på ytan ej basparade regionen ändras för exponering av resterna i det aktiva sätet när lipaset aktiveras, varigenom en lipidkontaktzon bildas vilken är lokaliserad inom den del av lipasstrukturen som innehåller den aktiva serinresten, och vilken består av en yta med ökad ythydrofobicitet som interagerar med lipidsubstratet vid eller under hydrolys, vari den elektrostatiske laddningen och/eller hydrofobiciteten för lipidkontaktzonen har ändrats genom deletion eller substitution av en eller flera negativt laddade aminosyrarester i lipidkontaktzonen med neutral(a) eller positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom substitution av en eller flera neutrala aminosyrarester med positivt laddad(e) aminosyrarest(er) och/eller genom deletion eller substitution av en eller flera hydrofila aminosyrarester med hydrofob(a) aminosyrarest(er), med det förbehållet att nämnda lipasvariant skiljer sig från varianter av ett sådant moderlipas som är isolerbart från *Pseudomonas putida* ATCC 53552, i vilken Gln vid position 127 har ersatt Arg och/eller Phe-resten vid position 207 har ersatt Thr, Gly, Lys eller Ala.
2. Lipasvariant enligt krav 1, vari en eller flera glutaminsyra- eller asparginsyrarester i nämnda lipidkontaktzon är substituerade med glutamin, asparagin, alanin, leucin, valin, serin, treonin, lysin eller arginin.
3. Lipasvariant enligt krav 1 eller 2, vari moderlipaset är ett mikrobiellt lipas.

4. Lipasvariant enligt krav 3, vari moderlipaset är ett fungalt lipas, företrädesvis erhållet från en stam av Humicola eller Rhizomucor.

5. Lipasvariant enligt krav 4, vari moderlipaset är ett Rhizomucor miehei-lipas.

6. Lipasvariant enligt krav 5, vari en eller flera aminosyrarester är substituerade enligt följande:

10 D91N,K,R,A,V,L,S,T;
D256N,K,R,A,V,L,S,T;
D226N,K,R,A,V,L,S,T;
D61N,K,R,A,V,L,S,T;
D113N,K,R,A,V,L,S,T;
E201Q,K,R,A,V,L,S,T; or
15 D243N,K,R,A,V,L,S,T.

7. Lipasvariant enligt krav 4, vari moderlipaset är ett Humicola lanuginosalipas.

20 8. Lipasvariant enligt krav 7, vari en eller fler aminosyrarester är substituerade enligt följande:

E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V;
D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
25 E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V;
E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V;
D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V;
D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
30 E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
35 D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V;
E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V;

5 T267K,R;
 S85K,R;
 T226K,R;
 N88K,R;
 N92K,R;
 I255K,R;
 10 I202K,R;
 L206K,R;
 R209A
 L259K,R;
 V203K,R; or
 15 L227K,R;

särskilt en lipasvariant innefattande följande substitutioner:

20 E87Q + D254N + D242N + E210Q;
 E87Q + D254N + E210Q;
 D96N + E87Q + D254N;
 R209A + E210A;
 R209A+R210A+D96L; or
 25 E210Q+D242N+D254N

9. Lipasvariant enligt krav 3, vari moderlipaset
 är ett jästlipas, t.ex. erhållet från en stam av Candida,
 30 eller ett bakteriellt lipas, t.ex. erhållet från en stam
 av Pseudomonas.

10. DNA-konstruktion innefattande en DNA-sekvens
 som kodar för en lipasvariant enligt något av kraven 1-9.

11. Rekombinant expressionsvektor, vilken bär en
 35 DNA-konstruktion enligt krav 10.

12. Cell som är transformerad med en DNA-konstruk-
 tion enligt krav 10 eller en vektor enligt krav 11.

13. Cell enligt krav 12, vilken är en fungal cell, t.ex. hörande till släktet *Aspergillus*, såsom *A. niger*. *A. oryzae* eller *A. nidulans*; en jästcell, t.ex. hörande till en stam av *Saccharomyces*, såsom *S. cerevisiae*, eller
5 en metylotrofisk jäst från släktet *Hansenula*, såsom *H. polymorpha*, eller *Phichia*, såsom *P. pastoris*; eller en bakteriell cell, t.ex. hörande till en stam av *Bacillus*, såsom *B. subtilis* eller *B. lentus*.

14. Cell enligt krav 12, vilken är en växtcell,
10 t.ex. hörande till *Solanaceae*, såsom *Solanum tuberosum*, eller *Nicotiana tabacum*.

15. Förfarande för framställning av en lipasvariant enligt något av kraven 1-9, vari en cell enligt något av kraven 12-14 odlas eller tillåts växa under förhållanden
15 som gynnar framställningen av lipasvarianten och lipasvarianten därefter utvinns från odlingen eller växten.

16. Detergenttillsats innefattande en lipasvariant enligt något av kraven 1-9, eventuellt i form av ett granulat som inte dammar, en stabiliserad vätska eller ett
20 skyddat enzym.

17. Detergenttillsats enligt krav 16, vilken innehåller 0,02-200 mg enzymprotein/g tillsats.

18. Detergenttillsats enligt krav 16 eller 17, vilken dessutom innefattar ytterligare enzym, såsom ett proteas, amylas, peroxidas och/eller cellulas.
25

19. Detergentkomposition innefattande en lipasvariant enligt något av kraven 1-9.

20. Detergentkomposition enligt krav 19, vilken dessutom innefattar ytterligare enzym, såsom ett proteas, amylas, peroxidas och/eller cellulas.
30

1/9

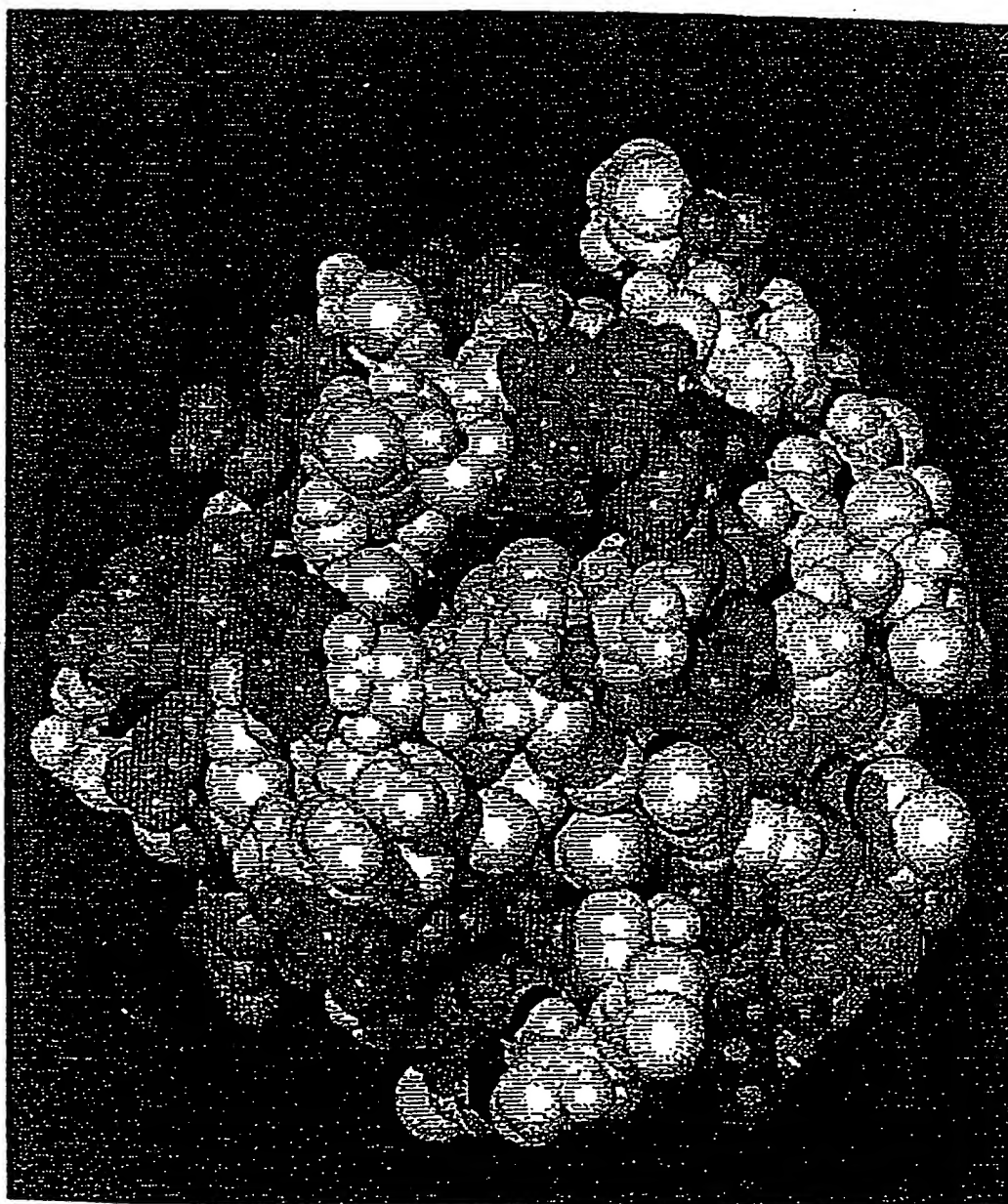


Fig. 1a

2/9

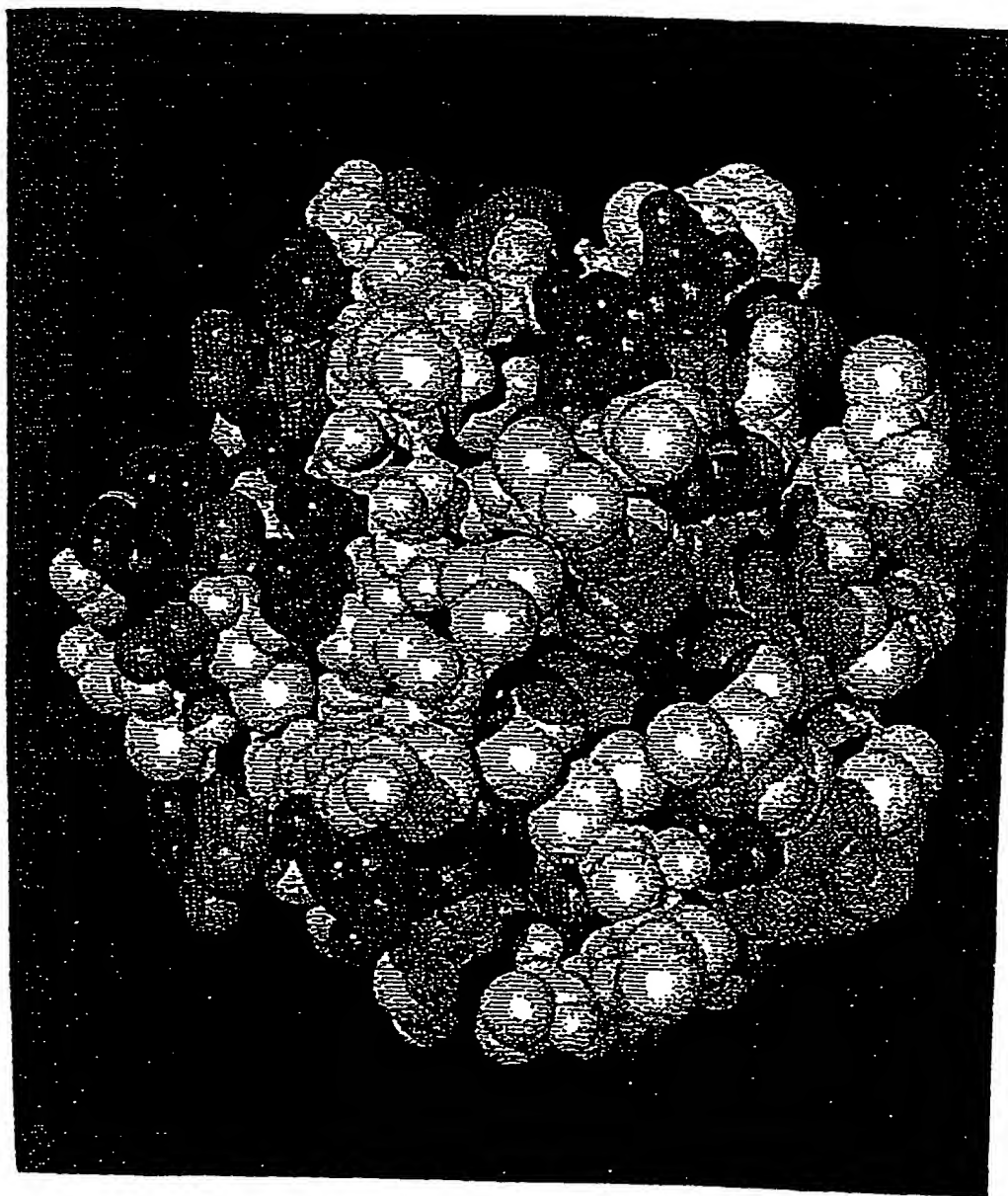


Fig. 1b

3/9

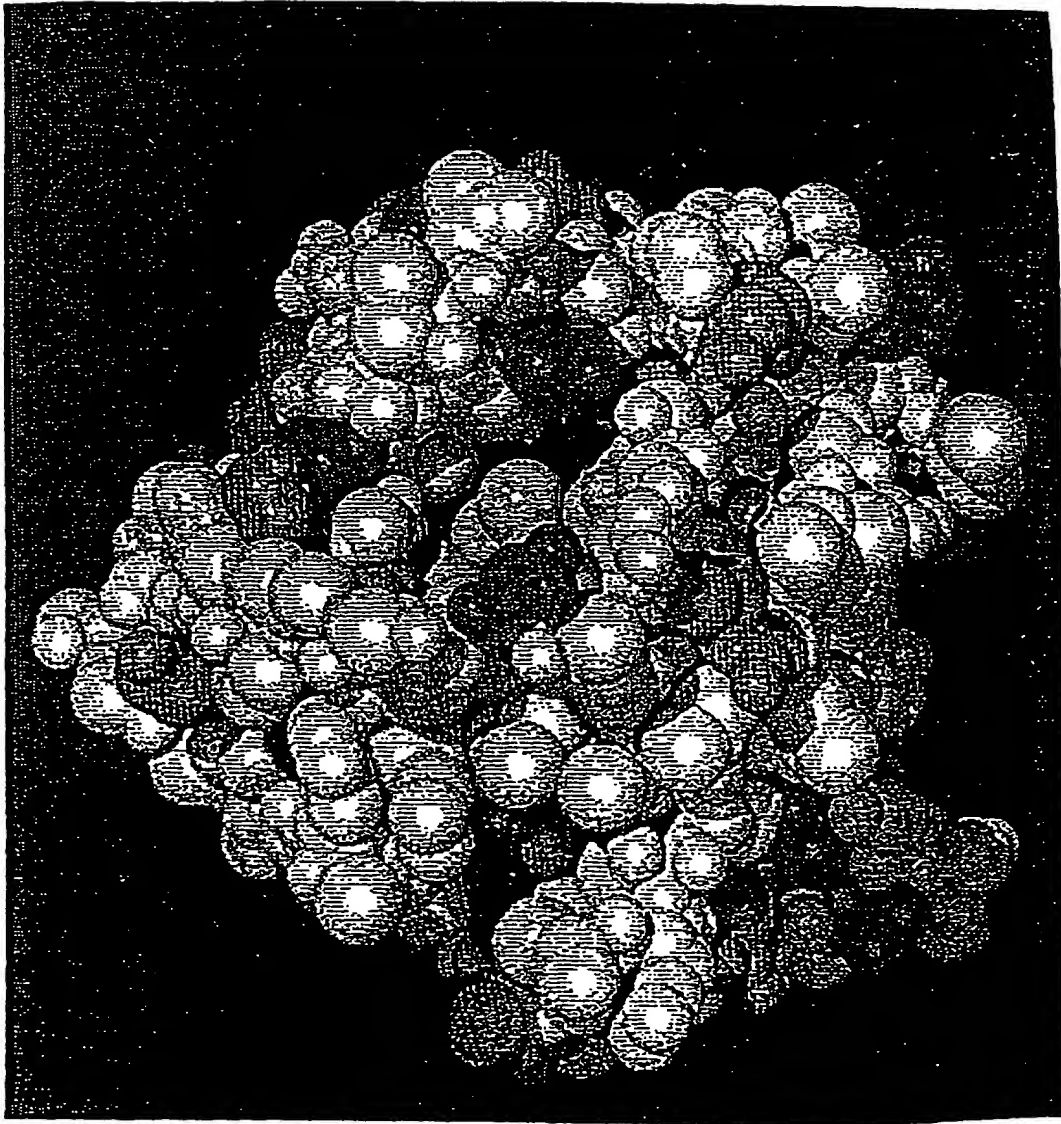


Fig. 2a

4/9

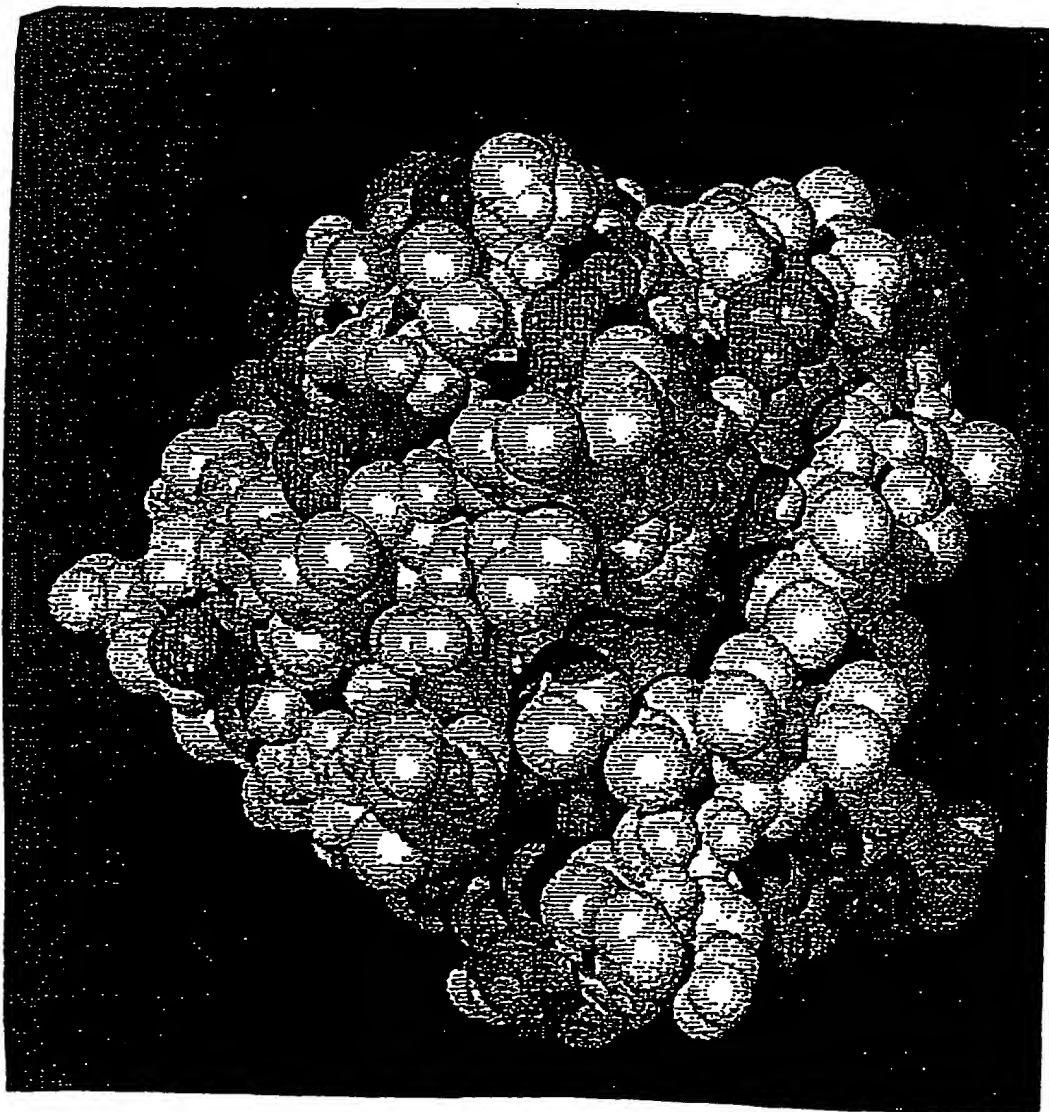


Fig. 2b

5/9

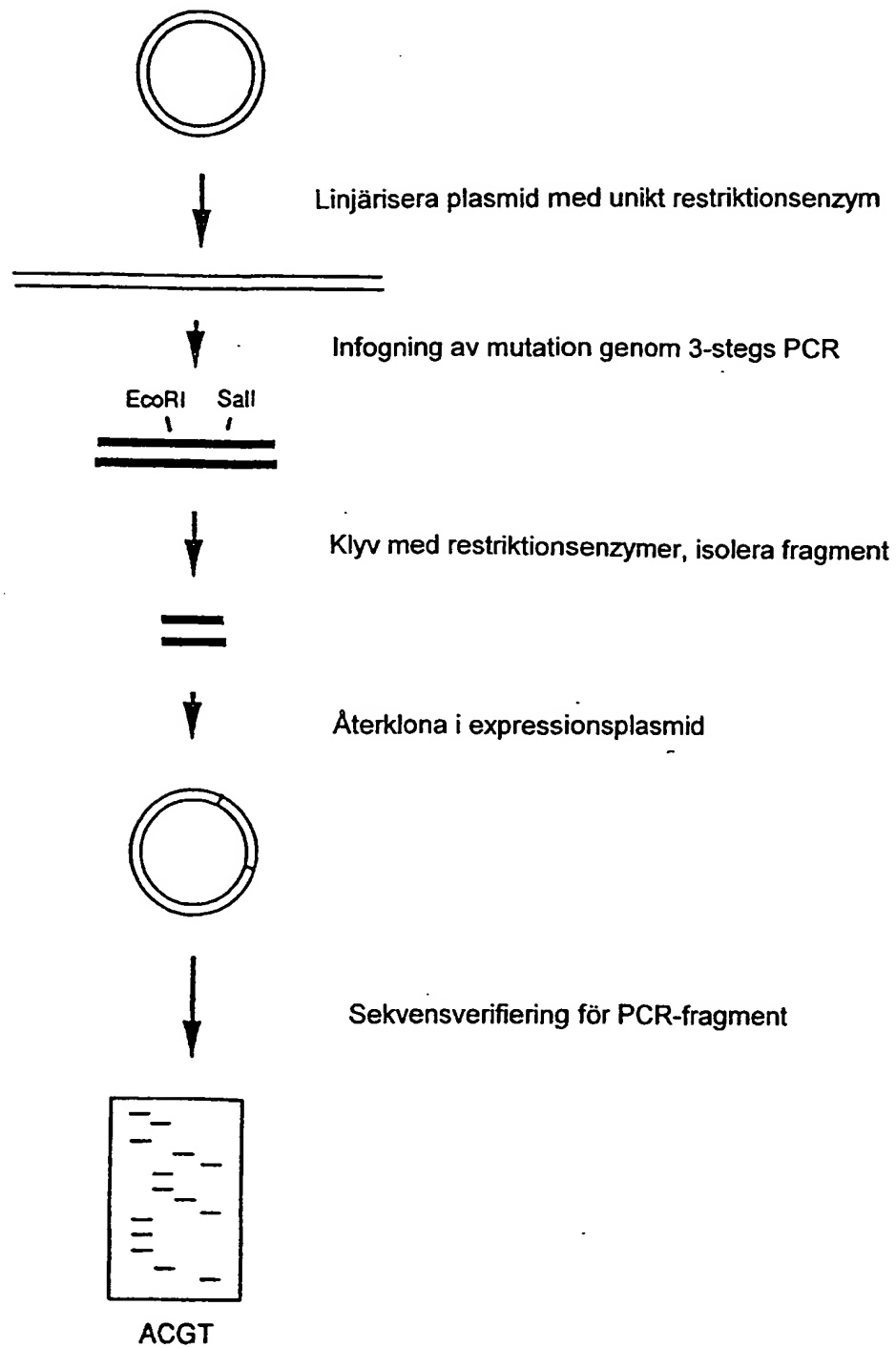


Fig. 3

6/9

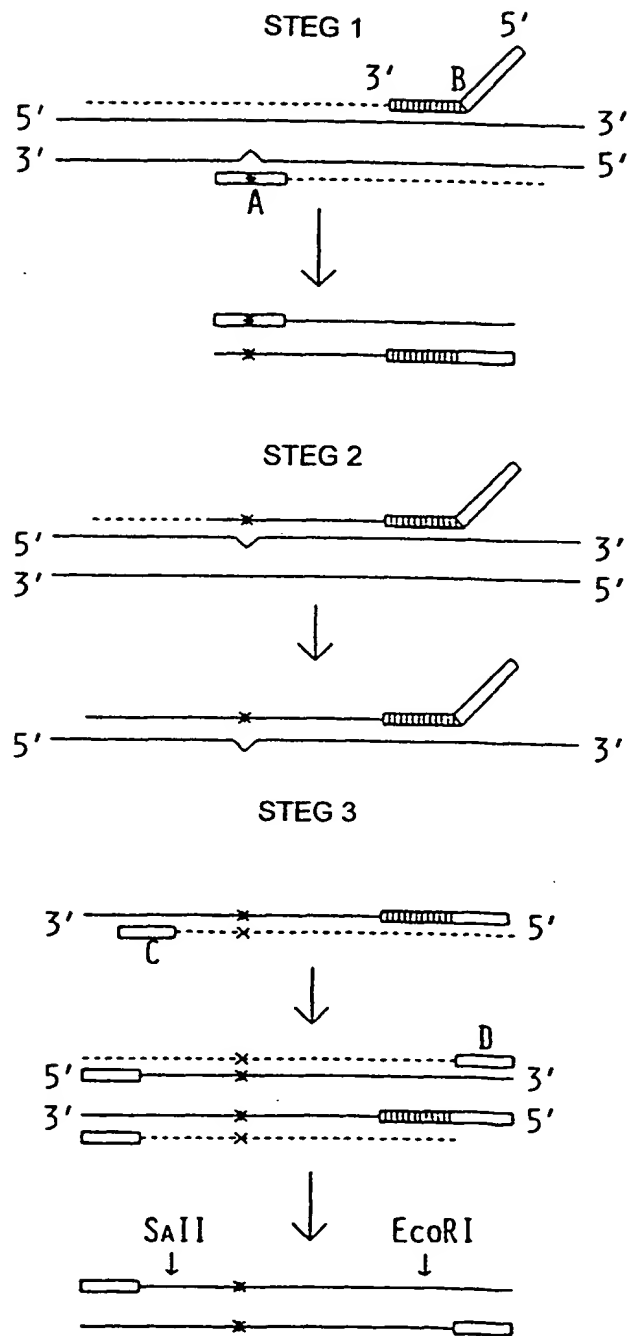


Fig. 4

7/9

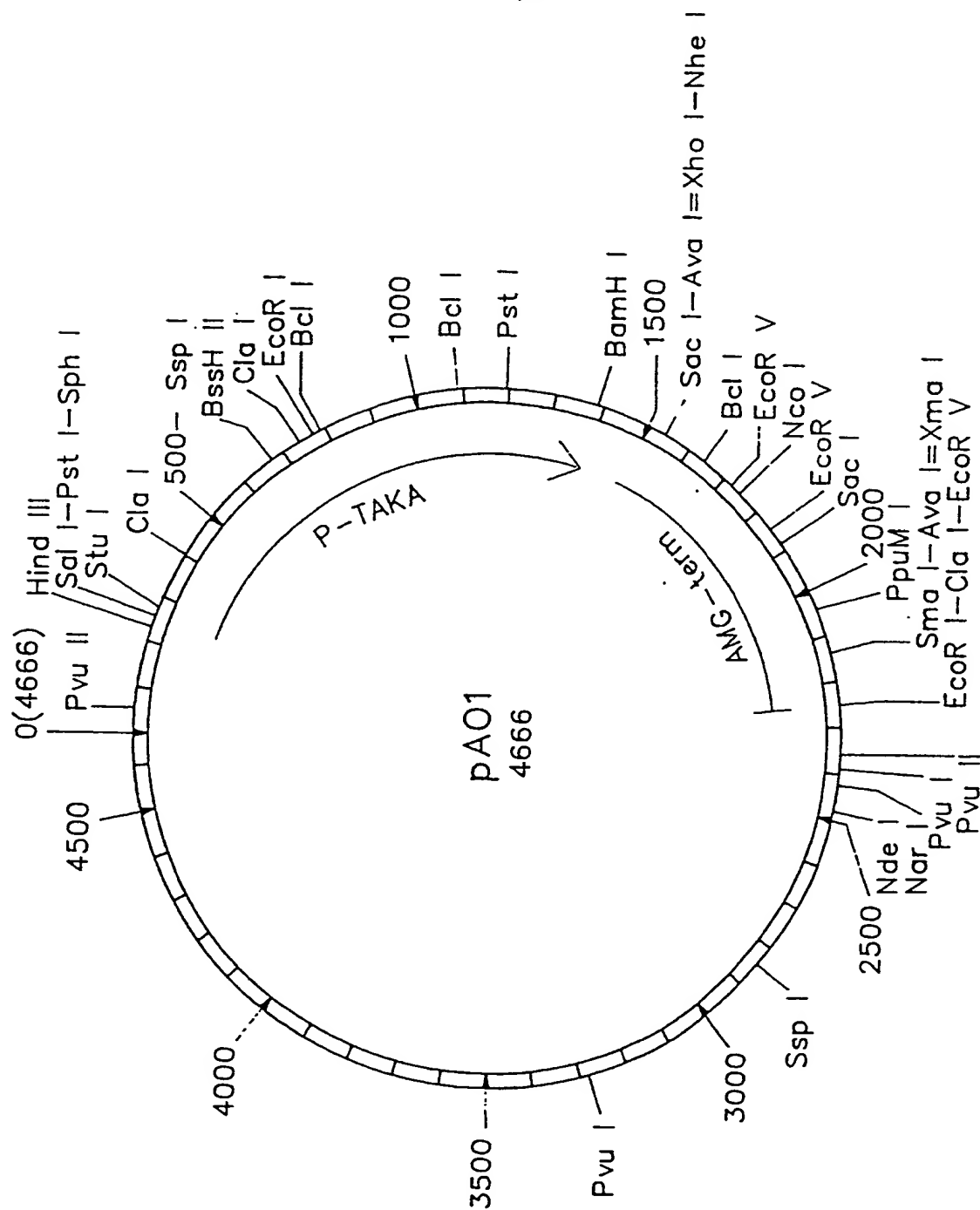


Fig. 5

8/9

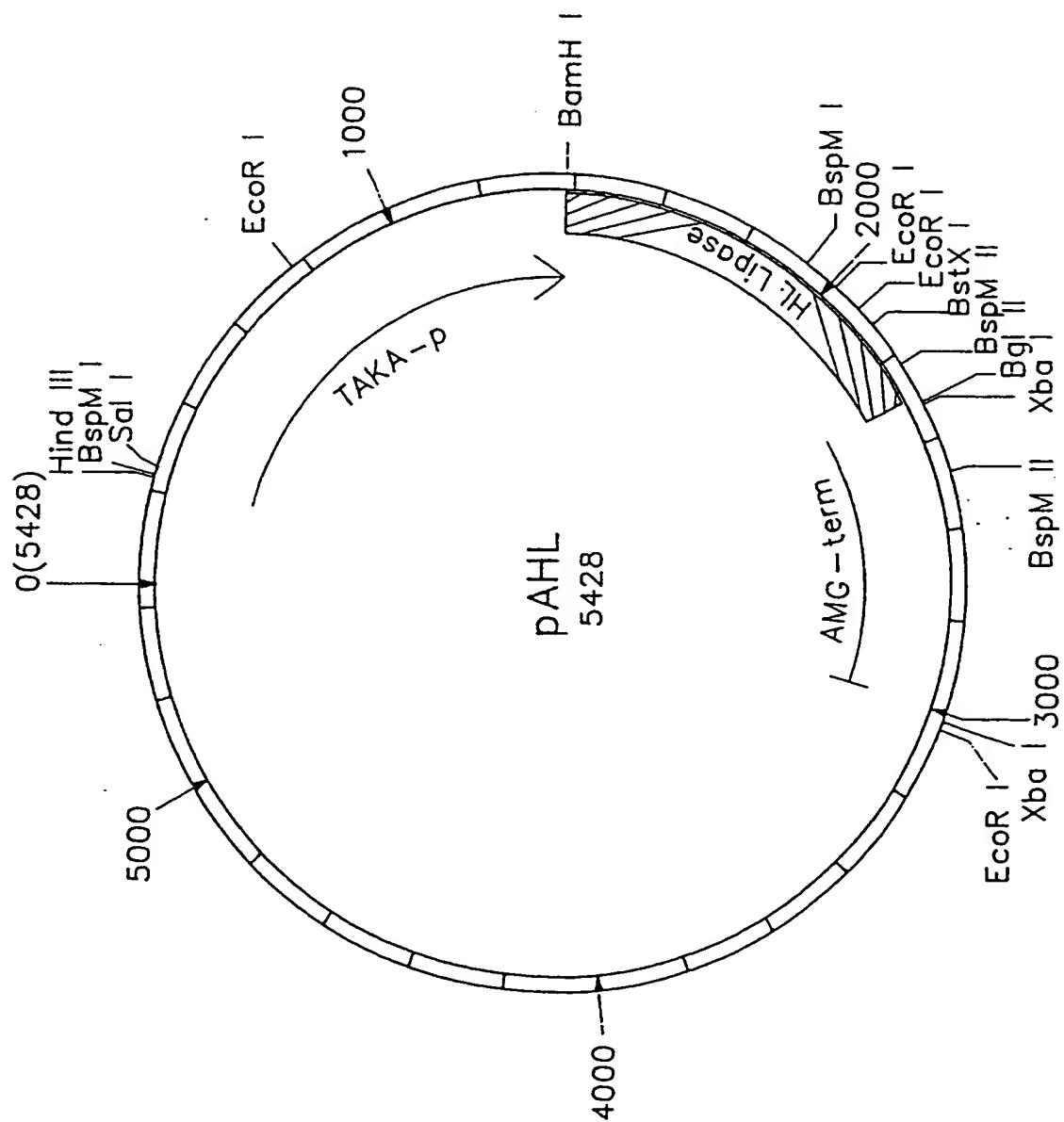


Fig. 6

9/9

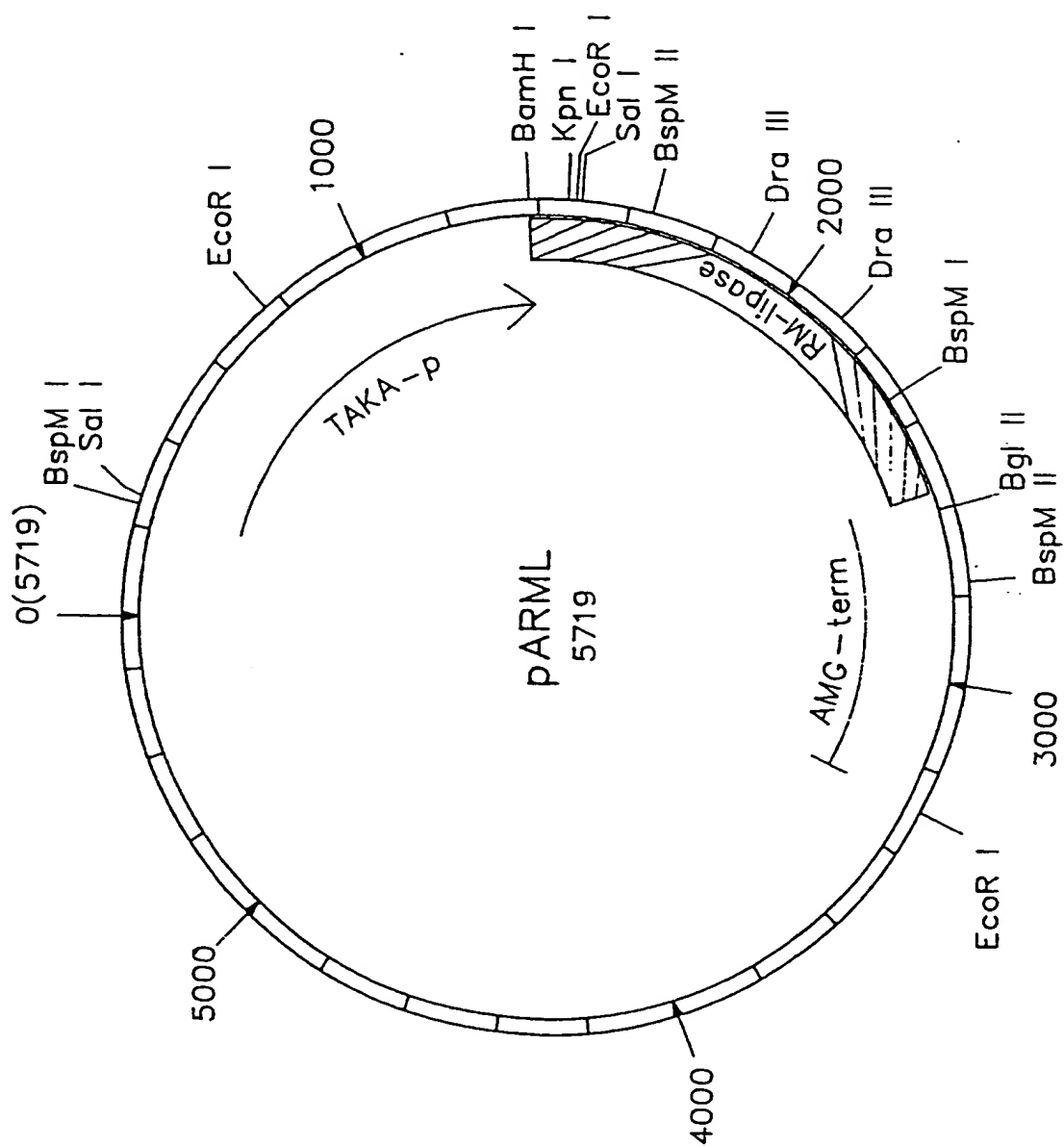


Fig. 7